Význam otiskové cytologie pro vyšetření povrchu oka

doc. Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.

Laboratoř biologie a patologie oka, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Otisková cytologie (OC) je jednoduchá relativně neinvazivní a pacienta netraumatizující metoda pro vyšetření povrchu oka, zejména spojivky. Využívá přilnavosti povrchové vrstvy buněk na vhodný materiál. Získaný buněčný monolayer lze zpracovat přímo na odběrovém materiálu, histologicky barvit na nitrocelulózovém filtru, či na polyethersulfonu provést imunofluorescenční detekci proteinů. Buňky je možné z odběrového materiálu separovat a dále použít (kultivace, DNA analýza, průtoková cytometrie, lipidomika).

Monitorování úspěšnosti léčby, základní výzkum: OC se uplatňuje při hodnocení onemocnění spojivky a rohovky, u nichž se předpokládají změny na povrchu oka (nádory spojivky, akantamébová keratitida, syndrom suchého oka), **Obr.1**. Pacientům s těžkou formou syndromu suchého oka (dry eye disease, DED), nereagujícím zlepšením na léčbu umělými slzami, jsme po dobu tří měsíců aplikovali 20% autologní sérum. Stav před a po léčbě jsme hodnotili klinickými testy, laboratorně – OC, a na základě subjektivního posouzení pacienty. Po aplikaci došlo ke zlepšení klinických parametrů. Pomocí OC jsme zjistili, že podávání autologního séra vede k útlumu skvamózní metaplázie a k poklesu počtu apoptotických buněk. Na základě výsledků jsme standardizovali léčbu DED pomocí autologního séra.

OC ukázala, že specifický fenomén postihující epitelové buňky spojivky pacientů s DED – hadovitý chromatin (HC) – je závislý na intenzitě onemocnění. Prokázali jsme, že HC není formou apoptózy, že morfologické změny typické pro HC korelují s desintegrací laminu A/C a relokalizací jadérkových proteinů do ekvatoriální roviny jádra. Morfologická stádia jader s HC spolu se zvýšeným počtem mikrojader indikují, že tento fenomén souvisí s dělením jádra a buňky za patologických podmínek (dysbalance kyslíku).

Diagnostika, screening: Deficience limbálních kmenových buněk vzniká na základě poruch v oblasti limbu (oblast mezi epitelem rohovky a spojivky, ve které se nacházejí kmenové buňky pro epitel rohovky). Projevuje se přerůstáním epitelu spojivky přes rohovku, vaskularizací rohovky a ztrátou zraku. V případě, že porucha není klinicky zřetelná, diagnostikuje se ze vzorků odebraných z rohovky oka pomocí OC. Diagnóza je potvrzena na základě přítomnosti pohárkových buněk na povrchu rohovky (fyziologicky jsou tyto buňky pouze ve spojivce). V případě silně poškozeného povrchu oka, např. po poleptání, kdy dochází k vymizení pohárkových buněk ve spojivce, je možné provést diagnostiku na základě přítomnosti márkrů spojivkového epitelu (např. keratin 7, 14) na rohovce.

Spojení OC, genotoxického vyšetření (mikronukleus test plus cytome assay, MCyt) a morfologického hodnocení (skvamózní metaplázie, zánětlivé změny) umožní podrobné vyšetření stavu povrchu oka. Lze tak charakterizovat změny navozené externími stimuly (environmentální, pracovní prostředí) i poškození plynoucí z patologií oka. Metoda je vhodná k včasné detekci změn souvisejících s neopláziemi na povrchu oka nebo určení, která z diferenciačních diagnóz (např. intraepiteliální neoplázie spojivky vs. mukózní pemfigoid) je pravděpodobnější.

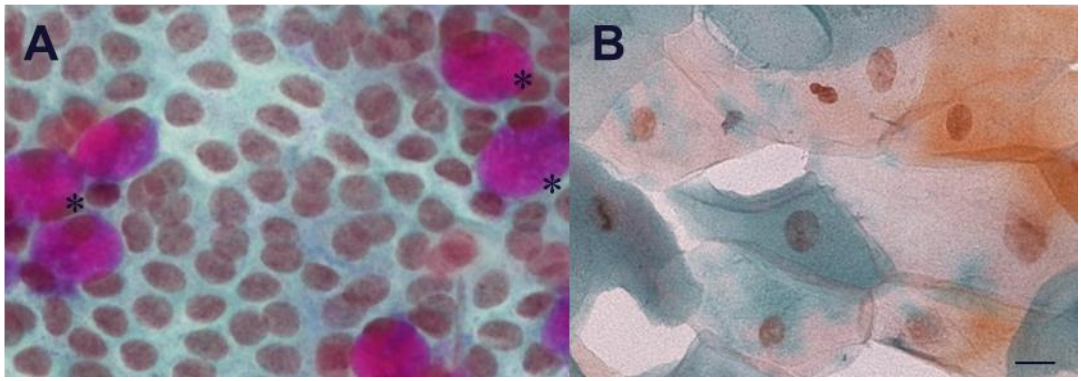
OC je metoda, která zásadně přispěla k porozumění patologií očního povrchu (infekce, zánět, neoplázie). Její význam přerostl ze základního výzkumu do diagnostiky a monitorování účinnosti léčby. OC ve spojení s detailním genotoxickým vyšetřením a dalšími buněčně-molekulárními přístupy rozšiřuje a prohlubuje možnost získat informace o stavu povrchu oka, ale i o charakteru a intenzitě jeho poškození, případně o probíhajícím onemocnění.

Jirsova K, Dudakova L, Kalasova S, Vesela V, Merjava S. The OV-TL 12/30 clone of anti-cytokeratin 7 antibody as a new marker of corneal conjunctivalization in patients with limbal stem cell deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Jul 29;52(8):5892-8. doi: 10.1167/iovs.10-6748. PMID: 21693612; PMCID: PMC3176045. IF: 3,882

Jirsova K, Brejchova K, Krabcova I, Filipec M, Al Fakih A, Palos M, Vesela V. The application of autologous serum eye drops in severe dry eye patients; subjective and objective parameters before and after treatment. Curr Eye Res. 2014 Jan;39(1):21-30. doi: 10.3109/02713683.2013.824987. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24074049. IF: 2,025

Jirsova K, Vesela V, Skalicka P, Ruzickova E, Glezgova J, Zima T, Dusinska M, Collins A, Bednar J. The micronucleus cytome assay - A fast tool for DNA damage screening in human conjunctival epithelial cells. Ocul Surf. 2021 Mar 4:S1542-0124(21)00011-2. doi: 10.1016/j.jtos.2021.02.011. Epub ahead of print. PMID: 33677062. IF: 12,336

Obr.1



Povrch spojivky: A – zdravá spojivka (epitelové a pohárkové buňky*), B – spojivka pacienta se syndromem suchého oka (skvamózní metaplázie).